

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
長 塚 仁 印	実験計画の立案、実験、評価の指導
印	
印	

## 学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野 口腔病理学分野	身分 大学院生	氏名 于 湊
論文 題 名 GFP骨髄移植マウスを用いた異所性骨形成における骨髄由来細胞の役割の解明		
論文内容の要旨（2000字程度）		
<p>【目的】</p> <p>再生医療研究の発展に伴い骨髄由来細胞の多分化能が明らかとなり、様々な組織の修復や維持への関与が報告されている。しかし、骨形成における骨髄由来細胞の関与については未だ明らかではない。</p> <p>我々が以前行った GFP 骨髄移植モデルマウスを用いた骨折の治癒機転における同所性骨形成モデルでは、骨髄由来細胞はマクロファージや破骨細胞等へ分化したが、骨芽細胞や軟骨細胞への分化は確認できず、骨芽細胞は局所に存在する組織幹細胞に由来すると考えられた。しかし、このような同所性骨形成モデルでは、すでに骨形成のための環境が局所に存在するため、骨髄由来細胞の役割を明確にすることは困難である。</p> <p>そこで、本研究では骨髄由来細胞の骨形成における役割を明らかにするため、GFP 骨髄移植マウスを用いて異所性骨形成モデルを作製し、骨髄由来細胞の動態や局在を経時的に検討した。</p> <p>【材料および方法】</p> <p>実験には7週齢雌性C57BL/6野生型マウス34匹および同系7週齢GFPトランスジェニックマウス（GFPマウス）16匹を用いた。野生型マウスに10Gyの放射線照射後、GFPマウス大腿骨と脛骨から採取した骨髄細胞を尾静脈から1個体当たり<math>1 \times 10^7</math> cells移植した。骨髄細胞移植1ヶ月後に移植細胞の生着を確認し、異所性骨形成モデルとして大腿部筋中と背部皮下にrhBMP-2 <math>10 \mu g</math> を含浸させたラット脱灰骨（Insoluble bone matrix : IBM）150mgを埋入した。</p> <p>IBM 移植後 7、14、28 日目に移植した IBM/rhBMP-2 を摘出し、軟エックス線写真撮影を行って硬組織形成状態を観察した。摘出した全ての試料は4%パラホルムアルデヒド固定液で12時間浸漬固定し、10%EDTA 溶液にて2週間脱灰した。脱灰後、常法に従ってパラフィン包埋、厚さ <math>5 \mu m</math> の連続切片を作製し、HE 染色、GFP、Osteocalcin(OC)に対する免疫組織化学的染色を施した。大腿部筋中に IBM/rhBMP-2 を移植したものは、大腿骨周囲、筋周囲、IBM 中央部の3部位、背部皮下に IBM を移植したものは皮膚側、筋側の2部位、計5部位において組織学的に検討を行った。</p>		

またこの 5 部位において抗 GFP 染色した標本で GFP 陽性細胞数をカウントし、HE 染色標本において形成された硬組織面積を計測することにより骨髄由来細胞と異所性骨形成の相関について検討した。

#### 【結果】

GFP 骨髄移植マウスの骨端部骨髄では血球系細胞がドナー由来骨髄細胞に置換されており、骨髄移植による造血系再構築が起こったことが確認された。骨端軟骨板では肥大軟骨細胞層直下の多核巨細胞や単核の破軟骨細胞、破骨細胞が GFP 陽性を示したが、増殖軟骨細胞、肥大軟骨細胞、また骨周囲に配列する骨芽細胞は GFP 陰性を示した。

軟エックス線写真において、IBM/rhBMP-2 移植後の骨形成過程を観察したところ、7 日目では IBM 周囲に僅かに不透過像が観察され始め、14 日目では徐々にエックス線不透過像が鮮明になり、28 日目には IBM 周囲を囲むように連続した不透過像を認め、IBM 周囲における経時的な骨形成が確認された。

組織学的観察において、IBM/rhBMP-2 移植後 7 日目では、大腿骨周囲に軟骨形成を認め、その他の部位では GFP 陽性の類円形や紡錘形の細胞からなる肉芽様組織の形成を認めた。14 日目では、大腿部筋周囲や背部皮下においても GFP 陽性の類円形や紡錘形細胞からなる肉芽組織中から軟骨や骨組織形成を認めた。形成された骨組織中の骨芽細胞は GFP-OC 蛍光免疫二重染色において骨髄由来でないことを確認した。28 日目では、IBM 周囲に形成された新生骨組織は吸収され、形成された骨組織内部に GFP 陽性の血球系細胞を含む骨髓腔が形成され、残存した骨組織周囲に GFP 陽性の破骨細胞を認めた。

GFP 陽性細胞は大腿骨周囲と筋周囲、背部皮下筋側では 7 日目が最も多く、経時的に減少傾向を示した。一方、背部皮下皮膚側と IBM 中央部では経時的に GFP 陽性細胞の増加を認めた。形成された硬組織面積は大腿骨周囲が最も大きく、背部皮下筋側、筋周囲の順であった。

#### 【考察】

本研究における異所性骨形成において骨髄由来細胞は、肉芽組織様の類円形や紡錘形細胞、骨吸収に関わる破骨細胞等、多様な細胞に分化したが、骨芽細胞や軟骨細胞への分化は確認できなかった。また GFP 陽性骨髄由来細胞は硬組織形成前に動員され、硬組織形成後には GFP 陽性細胞数は経時的に減少した。大腿骨周囲、筋周囲が背部皮下皮膚側と比較して GFP 陽性細胞の集積は早期でかつ集積数が多く、また形成される硬組織面積が多かった。つまり、GFP 陽性細胞の動員時期や数には部位により違いがあった。以上のことから、異所性骨形成における骨髄由来細胞の主な役割は、骨芽細胞への分化による直接的な骨再生ではなく、組織幹細胞に働きかけ、それらを骨芽細胞に分化させるとともに、骨形成のための微小環境形成に寄与している可能性が示唆された。